

**TÍTULO:** Produção de Linfócitos T Infiltrados em Tumores Metastáticos de Melanoma para Terapia Celular Avançada.

**Autores:** Renato Santos de Oliveira Filho<sup>1</sup>, Daniel Arcuschin de Oliveira<sup>1</sup>, Ana Carolina Buzzo Stefanini<sup>2</sup>, Laura Leaden<sup>2</sup>, Gustavo Schvartsman<sup>2</sup>, Luciana Cavalheiro Marti<sup>2</sup>.

1- Disciplina de Cirurgia Plástica da EPM/UNIFESP

2- Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo-SP

**Conflito de Interesse:** Financiamento pelo PRONON e CNPq

## **RESUMO**

**Introdução:** Dentre as estratégias emergentes para tratamento do melanoma avançado, destaca-se a Terapia Adotiva com Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs), recentemente aprovada pelo FDA (lifileucel). Os TILs são células do sistema imune que migram para o microambiente tumoral e apresentam capacidade de reconhecer e destruir células neoplásicas<sup>1,2</sup>. Relatamos nossa experiência na etapa laboratorial inicial da terapia com TILs, desde a captação das amostras no centro cirúrgico até a fase de expansão rápida (REP) das células.

**Método:** Após captação das amostras de tecido de melanoma metastático de 22 pacientes, fragmentos de 1–3 mm<sup>3</sup> foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços. Procedeu-se à digestão enzimática, isolamento das células neoplásicas e dos TILs. Após caracterização, os TILs foram expandidos com IL-2 (convencional) e com IL-2 mais IL-7 (novo) utilizando o biorreator G-REX. Estes TILs foram colocados em contato com melanoma SK-MEL-24 e com cultura primária dos melanomas metastáticos.

**Resultados:** Das 22 amostras obtidas, 05 não confirmaram a presença de histopatológica de metástase. Foi possível expandir linfócitos com sucesso (acima de  $1 \times 10^8$  células) com IL-2 e com IL-2 em combinação com IL-7. O sucesso na expansão dos TILs foi maior na combinação IL-2+IL-7 (88,2%) do que apenas com IL-2 (58,8%), a combinação reduziu o número de dias para a expansão dos TILs e aumentou a quantidade de células obtidas ( $1,40 \times 10^8 \pm 5,5 \times 10^7$ ;  $1,81 \times 10^8 \pm 1,13 \times 10^8$  células). Após REP, foi realizado ensaio de citotoxicidade para avaliar a capacidade dos TILs em eliminar células tumorais (SK-MEL-24 e linhagem primária autóloga), sendo que houve mais morte celular na linhagem autóloga. Foi realizada também a mensuração de IFN-gama para avaliar a capacidade de secreção desta citocina pelos TILs, tendo sido maior no grupo onde foi utilizado IL-2 e IL-7 para expansão.

**Conclusão:** Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a combinação de IL-2 com IL-7 para expansão de TILs é promissora para

aplicações clínicas. Avanços recentes em engenharia genética têm ampliado o potencial dos TILs (como a superexpressão de receptores de quimiocinas, o uso de CRISPR-Cas9 gerando os chamados CRISPR-TILs). Futuras pesquisas devem focar na compreensão do microambiente tumoral, na redução do tempo de produção dos TILs, na melhoria da escalabilidade do processo, e na exploração de sinergias com imunoterápicos, terapias-alvo e drogas epigenéticas como inibidores de metilação<sup>3</sup>.

### Referências:

- 3- 1. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 15;12(4):298-306. doi: 10.1038/nrc3245.
- 4- 2. Betof Warner A, Corrie PG, Hamid O. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy in Melanoma: Facts to the Future. *Clin Cancer Res*. 2023 May 15;29(10):1835-1854. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1922.
- 5- 3. de Oliveira Filho RS, de Oliveira DA, Nisimoto MM, Marti LC. A Review of Advanced Cutaneous Melanoma Therapies and Their Mechanisms, from Immunotherapies to Lysine Histone Methyl Transferase Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2023 Dec 8;15(24):5751. doi: 10.3390/cancers15245751.

**PALAVRAS-CHAVE:** Terapia Celular, Melanoma, Linfócitos Infiltrantes de Tumor

**CONFLITO DE INTERESSE:** PRONON e CNPq

### INTRODUÇÃO:

O melanoma é um tipo de câncer de pele altamente agressivo, caracterizado por seu elevado potencial metastático e responsável pela maioria das mortes associadas aos cânceres cutâneos. No Brasil, onde grande parte do território se encontra em regiões intertropicais com elevada incidência solar, o câncer de pele não melanoma constitui a neoplasia maligna mais prevalente, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados. Já o melanoma representa aproximadamente 3% das neoplasias malignas cutâneas<sup>1</sup>.

A principal estratégia terapêutica para melanomas localizados continua sendo a ressecção cirúrgica. No entanto, nos últimos anos, a imunoterapia e a terapia-alvo emergiram como abordagens promissoras para o tratamento do melanoma avançado. Apesar disso, a maioria dos pacientes com doença metastática acaba desenvolvendo resistência a essas terapias, o que frequentemente culmina em óbito.

Dentre as estratégias emergentes, destaca-se a Terapia Adotiva com Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs, do inglês *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*), recentemente aprovada pelo FDA como tratamento de segunda linha. Os TILs são células do sistema imune que migram para o microambiente tumoral e apresentam capacidade de reconhecer e destruir células neoplásicas.

Os TILs compreendem uma população heterogênea de células linfoides, incluindo linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (Th) e linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (Tc). Entre os linfócitos Th, os Th1 desempenham um papel fundamental na resposta antitumoral por meio da secreção de IFN- $\gamma$ , enquanto os linfócitos T reguladores (Treg) exercem funções imunossupressoras, contribuindo para a tolerância tumoral. Outros subtipos, como os linfócitos Th17, podem modular a inflamação intratumoral, enquanto os linfócitos T auxiliares foliculares (Tfh) participam da ativação e manutenção das respostas das células B.

Os linfócitos Tc, por sua vez, são efetores diretos da imunidade antitumoral, sendo capazes de eliminar células tumorais por meio da liberação de grânulos citotóxicos contendo perforinas e granzimas. A presença dessas células no microambiente tumoral sugere que elas reconhecem antígenos tumorais. No entanto, a interação entre TILs e células neoplásicas é complexa e dependente do contexto imunológico local. A sinalização tumoral frequentemente promove um ambiente imunorregulador que pode suprimir a atividade imunológica efetora. Ainda assim, o sistema imune mantém a capacidade intrínseca de reconhecer e eliminar células tumorais<sup>2</sup>.

O processo de obtenção e aplicação clínica dos TILs compreende diversas etapas altamente especializadas. Inicialmente, os linfócitos que infiltram espontaneamente os tecidos tumorais são isolados a partir de amostras de ressecção cirúrgica ou de amostras de biopsia de pacientes com melanoma cutâneo metastático. Em seguida, essas células são cultivadas e expandidas *ex vivo*, com o objetivo de amplificar subpopulações específicas de linfócitos T citotóxicos (Tc) e T auxiliares do tipo 1 (Th1) com reatividade antitumoral, previamente presentes no microambiente tumoral.

Após a expansão, uma quantidade significativa de linfócitos T autólogos é infundida no paciente. Antes da infusão dos TILs, os pacientes são submetidos a um regime de linfodepleção não mieloablativo, geralmente baseado na administração de fludarabina e ciclofosfamida, com o intuito de reduzir a competição por fatores homeostáticos e eliminar células imunorreguladoras. Posteriormente à infusão celular, administra-se interleucina-2 (IL-2) com a finalidade de promover a expansão *in vivo* e a atividade funcional dos TILs transferidos<sup>3-6</sup>.

Os estudos pioneiros com TILs foram conduzidos pelo grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Steven Rosenberg<sup>7</sup>. Nesse trabalho inicial, TILs foram isolados de tumores murinos estabelecidos, incluindo os modelos de melanoma B16 e M3, e posteriormente expandidos *in vitro* na presença de interleucina-2 (IL-2). Após a expansão, essas células foram reinfundidas em camundongos portadores de tumores, resultando em respostas antitumorais significativas.

Adicionalmente, o grupo demonstrou que a administração combinada de IL-2 com a infusão de TILs potencializava a eficácia terapêutica, promovendo regressão de metástases pulmonares e hepáticas nos modelos tumorais avaliados. Com base nesses achados experimentais promissores, Rosenberg e colaboradores avançaram para os estudos clínicos, aplicando a terapia com TILs em pacientes com melanoma metastático.

Os resultados bem-sucedidos dessa abordagem translacional foram publicados em 1988, estabelecendo um marco no desenvolvimento da imunoterapia celular para o câncer<sup>8</sup>.

Betof Warner e colaboradores revisaram de forma abrangente o desenvolvimento da terapia com TILs para o tratamento do melanoma e de outros tumores sólidos, destacando experiências passadas e atuais, principais desafios, aspectos práticos e perspectivas futuras<sup>9</sup>.

A terapia moderna com TILs tem avançado significativamente em termos de processos de fabricação, protocolos terapêuticos, eficiência clínica e caracterização do produto celular. Um dos exemplos mais relevantes é o *Lifileucel*, uma infusão autóloga de TILs não geneticamente modificados, que demonstrou resultados promissores em pacientes com melanoma irresssecável em estágio III ou IV, previamente tratados com inibidores de PD-1<sup>3</sup>.

Em um estudo clínico internacional de fase II, multicêntrico, braço único e com desenho adaptativo, os TILs foram produzidos majoritariamente em um período inferior a três semanas, sem necessidade de modificação genética. A coorte avaliada incluiu 66 pacientes, a maioria com doença progressiva mesmo após terapia com bloqueadores de PD-(L)1 e com uma média de 3,3 linhas de tratamento anteriores. Nessa população, observou-se uma taxa de resposta objetiva (ORR) de 36%, incluindo duas respostas completas e 22 respostas parciais. A maior taxa de resposta, de 41%, foi identificada entre os pacientes que haviam recebido previamente tratamentos combinados com anti-PD-(L)1 e bloqueadores de LAG-3 (gene 3 de ativação de linfócitos).

Dados atualizados da coorte principal (n = 87) demonstraram uma taxa de resposta objetiva de 29%. Quando combinadas as duas coortes, a taxa de resposta global alcançou 31%, sugerindo um perfil terapêutico promissor e duradouro. Notavelmente, a taxa de resposta em 12 meses para pacientes com melanoma refratário previamente tratados com inibidores de PD-1 foi de 54%.

Os resultados clínicos obtidos com *Lifileucel* (produto de terapia celular) evidenciam o potencial significativo da terapia com TILs no melanoma avançado, consolidando-a como uma modalidade terapêutica em rápida evolução. Além disso, seu uso como abordagem complementar à imunoterapia baseada em anticorpos inibidores de checkpoint imune (ICI) reforça seu papel no arsenal crescente de terapias imunomoduladoras. Os dados acumulados até o momento demonstram não apenas a eficácia antitumoral de TILs não modificados, como também indicam que os avanços no entendimento do microambiente tumoral podem ampliar a janela terapêutica, revelando o verdadeiro potencial dessa estratégia celular<sup>10</sup>.

Relatamos nossa experiência na etapa laboratorial inicial da terapia com TILs, abrangendo desde a captação das amostras no centro cirúrgico até a fase de expansão rápida (*rapid expansion protocol* – REP). Discutimos o processo de isolamento e preparação dos TILs, os protocolos terapêuticos empregados, a aplicação de terapias

combinadas, bem como inovações que podem agregar valor terapêutico a essa abordagem celular.

### **OBJETIVO:**

Relatar nossa experiência na etapa laboratorial inicial da terapia com TILs, desde a captação das amostras no centro cirúrgico até a fase de expansão rápida das células.

### **MÉTODO:**

#### **- Recebimento e Processamento Inicial das Amostras**

Duas a três amostras frescas de linfonodos metastáticos, com aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> cada, foram obtidas de 17 pacientes submetidos a procedimento cirúrgico no Hospital São Paulo da EPM/UNIFESP. As amostras foram coletadas por um membro da equipe de pesquisa diretamente na sala cirúrgica, imediatamente acondicionadas em meio de cultura HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) suplementado com antibiótico e antimicótico, e transportadas ao laboratório do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein.

O cirurgião responsável, também integrante da equipe de pesquisa, selecionou as regiões viáveis da neoplasia, evitando áreas de necrose. Ao chegarem ao laboratório, os espécimes foram processados o mais rapidamente possível, a fim de preservar a viabilidade celular. O tecido tumoral foi então fragmentado em pequenos pedaços (aproximadamente 1–3 mm<sup>3</sup>), utilizando bisturi e tesoura estéreis.

#### **- Isolamento dos Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs)**

Os fragmentos tumorais, com aproximadamente 1–3 mm<sup>3</sup>, foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços, utilizando-se apenas o primeiro poço de cada fileira (linha), com um único fragmento por poço. A cada poço foi adicionado meio de cultura apropriado suplementado com 10% de soro humano AB, antibióticos e antimicóticos, L-glutamina, sódio piruvato, aminoácidos não essenciais e citocinas específicas (6000UI - IL-2) para promover a ativação e expansão dos linfócitos.

As culturas foram monitoradas ao longo de 12 a 14 dias, período necessário para a liberação espontânea dos linfócitos a partir dos fragmentos tumorais. Durante esse período, foi realizada contagem celular regularmente em cada poço, a fim de avaliar a densidade celular e determinar a necessidade de redistribuição das células em dois ou mais poços, conforme a concentração alcançada. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado regularmente para garantir nutrientes adequados e remover metabólitos tóxicos.

#### **- Expansão REP**

As células previamente congeladas foram submetidas a uma segunda expansão, a expansão REP, onde as células foram descongeladas, expandidas em cultura com 3000UI de IL-2, anti-CD3 e *células feeder* (PBMC alogênicas irradiadas).

Nesta etapa as células foram expandidas em maior volume utilizando um biorreator (G-REX), a expansão nesta etapa é considerada bem-sucedida quando ocorreu expansão acima de 1 log (pelo menos  $1 \times 10^9$  células) de células viáveis.

#### **- Caracterização dos TILs expandidos na primeira fase**

As células expandidas em cultura que atingiram em 2-3 semanas o mínimo de  $1 \times 10^8$  linfócitos foram caracterizadas pela técnica citometria de fluxo e congeladas para seguir para a expansão REP.

Na caracterização por citometria de fluxo foram identificadas as populações de células expandidas como os linfócitos T CD4 e CD8, seus subtipos de memória, proporção de linfócitos T reguladores nas culturas, expressão de moléculas de regulação, senescência e exaustão, além de uma extensa avaliação de moléculas de migração celular (receptores de quimiocinas).

#### **- Digestão Enzimática e isolamento das células tumorais**

O tecido fragmentado foi submetido a uma digestão enzimática para dissociar as células tumorais, utilizando o kit de dissociação de tumores humanos (Miltenyi Biotec-Alemanha). De forma geral, o tecido foi incubado com enzimas em meio de cultura RPMI-1640 seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Após a digestão, a suspensão celular foi filtrada em um filtro de malha fina (100  $\mu$ m) para remover agregados e *debris* celulares.

As células foram lavadas com meio de cultura para remover as enzimas e resíduos e colocadas em cultura em placa de 6 poços com meio específico para crescimento de células tumoral, o sobrenadante foi removido após 72 horas de cultura e o poço foi lavado com meio de cultura para evitar crescimento e aderência de fibroblastos. As células foram cultivadas até atingirem a confluência de 70% e em seguida caracterizadas e congeladas.

As células tumorais foram caracterizadas para a expressão de antígenos tumorais como: homo sapiens MAGE Family member A (MAGE-A1), homo sapiens MAGE Family member A3 (MAGE-A3), homo sapiens G antigen 1 (GAGE1), transcript variant 2 (GAGE- ½), homo sapiens premelanosome protein (PMEL), transcript variant 1 (GP100/PMEL/S100), homo sapiens dopachrome tautomerase (DCT), transcript variant 2 (TRP-2 INT 2), Homo sapiens tyrosinase related protein 1 (TYRP1-TRP), Homo sapiens melan-A (MLANA, MELAN-A/MART-1), e como controles utilizamos os genes endógenos GAPDH e  $\beta$ -ACTINA. A expressão destes genes foi comparada a expressão destes mesmos genes em fibroblastos comerciais (MCR-5) e fibroblastos de cultura primária isolados de linfonodos saudáveis.

#### **- Controle de Qualidade**

Durante todo o processo, a viabilidade e a pureza das células foram monitoradas. A viabilidade foi avaliada utilizando o corante azul de tripan em lâmina e por citometria de fluxo utilizando Anexina-V e 7AAD.

A caracterização das subpopulações de linfócitos (citometria de fluxo) foi realizada antes da expansão inicial, após expansão inicial e após expansão REP. Foram realizados testes funcionais para avaliar a capacidade dos TILs de reconhecer e destruir células tumorais e secretar IFN- $\gamma$  após co-cultivo com as células tumorais (autólogas e de linhagem comercial – SK-MEL-24).

#### **- Criopreservação**

Após a expansão, os TILs foram criopreservados em freezer mecânico -80°C para uso futuro. Os linfócitos expandidos foram gradualmente congelados com auxílio de meio de criopreservação contendo 10% DMSO.

#### **RESULTADOS:**

Foram obtidas 22 amostras de tumor metastático, a maioria das metástases era localizada em linfonodos. Entretanto, das 22 amostras obtidas, 05 não confirmaram a presença de metástase de acordo com o resultado da patologia. Desta forma 17 amostras confirmaram a presença de metástase, destas amostras, foi possível expandir linfócitos com sucesso (acima de  $1 \times 10^8$  células) em 10 amostras, as 10 amostras foram expandidas tanto com IL-2 como também com IL-2 em combinação com IL-7 (58%).

Entretanto, se considerarmos a combinação de citocinas propostas por nós, que diferente do protocolo publicada além da IL-2, utiliza sua combinação com a IL-7, o sucesso das expansões das amostras com metástase confirmadas sobe de 10 (58%) para 15 amostras (88,3%) das 17 amostras que confirmaram a metástase.

Observamos que utilizando a combinação IL-2+IL-7 houve redução no número de dias em cultura dos fragmentos e aumento significativo na quantidade de linfócitos expandidos, sendo que em média com IL-2 obtivemos  $1,40 \times 10^8 \pm 5,5 \times 10^7$  células, enquanto com IL-2+IL-7 obtivemos cerca de  $1,81 \times 10^8 \pm 1,13 \times 10^8$  células. Mostrando maior eficiência na expansão utilizando a combinação de IL-2+IL-7, com redução do tempo em cultura das células, o que é bastante importante para a otimização do protocolo de expansão.

A proporção CD4:CD8 é similar entre os 2 tratamentos. Entretanto, com os dois tratamentos observamos uma inversão na relação CD4:CD8 comparada com o início da expansão, onde a população de CD8 que era em média na percentagem de  $29,8 \pm 10,75\%$  expandiram para IL-2:  $83,11 \pm 120,83\%$  e IL-2+IL-7:  $80,88 \pm 15,65\%$ , enquanto a população de CD4, reduziu sua percentagem de  $62,14 \pm 11,68\%$  inicial para IL-2:  $12,99 \pm 17,44\%$  e IL-2+IL-7:  $16,26 \pm 14,36\%$ . A distribuição das populações após esta expansão denota a prevalência de linfócitos T, sendo cerca de  $88,68 \pm 10,62\%$  no tratamento com IL-2, e cerca de  $90,73 \pm 9,55\%$  no tratamento com IL-2+IL-7.

Observamos redução significativa nas percentagens dos linfócitos T CD4 e CD8 naive no tecido metastático quando comparado aos circulantes, ou seja,  $(14,02 \pm 12\%$  e  $15 \pm 14\%)$  nos infiltrados para  $(23,7 \pm 10\%$  e  $52,80 \pm 16\%)$  no sangue periférico e aumento de linfócitos T de memória quando comparado aos circulantes, ou seja  $(61,45 \pm 20\%$  e  $55,59 \pm 23,5\%)$  nos infiltrados comparado a  $(47,79 \pm 16\%$  e  $17,69 \pm 9,07\%)$  no sangue

periférico. A diminuição da população de transição no tecido metastático comparada ao sangue periférico foi observada apenas para os linfócitos T CD4, ou seja, de (23,67±14,05%) no infiltrado tumoral, comparado a (30,77±11,03%) no sangue periférico.

Referente às subpopulações analisadas dentro destas anteriores, as quais chamarmos de: naïve (TN), efetora (TEF), memória efetora (TEM) e memória central (TCM), observamos que ocorre principalmente diminuição na percentagem dos linfócitos T CD4 e CD8 de TN no infiltrado do tecido metastático comparado ao sangue periférico, ou seja, (7,56±6,37% e 1,34±6,45%) no infiltrado comprado com (18,91±11,03% e 11,05±8,36%) no sangue periférico. Por outro lado, observamos o aumento dos linfócitos T CD8 TEM no infiltrado tumoral comparado ao sangue periférico, ou seja, de (39,45±22,26%) no infiltrado, comprado a (7,98±6,00%) no sangue periférico.

Após a expansão observamos que dentro das subpopulações de linfócitos T CD4, não houve variação significativa comparadas ao infiltrado tumoral, tanto para expansão com IL-2 como para a expansão com IL-2+IL-7. Dentre as subpopulações de linfócitos T CD8 houve redução significativa da população de transição  $9,73 \pm 10,55$  na expansão com IL-2 ( $p=0,0029$ ) quando comparadas a população inicial presente no infiltrado tumoral  $28,02 \pm 11,14\%$ , o mesmo, não foi observado para o tratamento com IL-2+IL-7.

Estes resultados indicam que a expansão com IL-2 + IL-7 é mais uniforme dentre as amostras, ambos tratamentos favorecem a expansão de linfócitos T CD8 sobre o CD4, e dentre os tratamentos observamos que o tratamento com IL-2 reduz de forma significativa a população de transição tanto para CD4 como para CD8. A população de transição em linfócitos T CD4 compreende as células T efetoras e em CD8 a população de transição compreende uma população de linfócitos T mais indiferenciada conhecido como *stem cell memory*, que tem maior capacidade de expansão e diferenciação. Sugerindo que a presença de IL-7 nas culturas pode favorecer o perfil de linfócitos com capacidade citotóxica e permanência de populações com maior capacidade expansão.

Analizamos também a presença de linfócitos regulatórios durante a expansão e observamos que houve redução na percentagem de linfócitos T que podem ser considerados reguladores (Tregs), estas células são presentes no ambiente tumoral e contribuem para a evolução tumoral inibindo a resposta imune efetora. Neste estudo, observamos que utilizando tanto o tratamento com IL-2 como a combinação IL-2+IL-7 comparados a população inicial infiltrada na metástase, não favorecemos a expansão da população de Treg. A percentagem de Tregs foi analisada dentro da população de linfócitos CD3, CD4, CD127<sup>low</sup> e CD25<sup>hi</sup>, esta população compreende os linfócitos T regulatórios, e observamos que no infiltrado tumoral cerca de  $3,16 \pm 2,24\%$  dos linfócitos tinham essas características. Entretanto, após expansão com IL-2 esta percentagem diminui para  $0,06 \pm 0,09\%$  ( $p=0,003$ ) e no tratamento com IL-2 + IL-7 esta percentagem diminui para  $0,19 \pm 0,43$  ( $p=0,015$ ). Mostrando que a utilização de IL-2 em altas doses não induz a diferenciação para este fenótipo regulador.

Foram realizadas 2 expansões REP (TIL19 e TIL21) que utilizou o número de células iniciais  $1 \times 10^7$  células, estas células foram estimuladas com  $2 \times 10^8$  *feeder* irradiadas com



12.500rads e anti-CD3. As células TIL19 expandiram mais de 1 log em 12 dias de cultura, enquanto as células TIL21 expandiram mais de 2 logs em 12 dias, a variação nas expansões se deve a variação biológica entre os doadores e diferenças entre os tumores metastáticos de onde foram obtidas.

Após a expansão REP, as subpopulações de linfócitos T CD4 variam, havendo diminuição dos linfócitos T naive (de 43% para 0,15%) e aumento dos linfócitos T de memória (de 42,3% para 88,1%), o que indica aumento de linfócitos T de memória efetora e memória central, importantes para eliminação tumoral. Enquanto nas subpopulações de linfócitos T CD8 ocorre aumento na população de transição (de 19,6% para 30,2%), a qual compreende uma população bastante importante de linfócitos T de memória com grande capacidade de sobrevivência e expansão (*T stem cell memory-like*), diminuição dos linfócitos T naive e manutenção das populações de memória.

Após a expansão REP foi realizado um ensaio de citotoxicidade para avaliar a capacidade dos linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em eliminar células tumorais. Para este ensaio, utilizamos linfócitos efetores derivados do TIL-21. Como células-alvo (target), empregamos a linhagem tumoral comercial SK-MEL-24 e a linhagem primária autóloga (MEL-21), também derivada do TIL-21. Os co-cultivos foram realizados em diferentes proporções de células efetoras para células-alvo (1:1 e 10:1) e analisados em dois tempos de incubação (24h e 48h).

Resultados utilizando a linhagem SK-MEL-24 mostraram que após 24 horas de co-cultivo, não foi observada morte tumoral na proporção 1:1 (efetores:alvo), enquanto na proporção 10:1 registramos 3,46% de morte celular. Após 48 horas, a citotoxicidade permaneceu ausente na proporção 1:1, mas aumentou para 4,07% na proporção 10:1.

Resultados utilizando a linhagem autóloga MEL-21 mostraram que após 24 horas, a morte tumoral foi inexistente na proporção 1:1 e atingiu 2,77% na proporção 10:1. Após 48 horas, a ausência de citotoxicidade foi mantida na proporção 1:1, enquanto a taxa de morte celular aumentou significativamente para 12,11% na proporção 10:1.

Os resultados indicam que a citotoxicidade dos TILs é influenciada pela proporção de células efetoras em relação às células-alvo, reforçando a importância do número de linfócitos para a eficácia da resposta antitumoral. Além disso, a especificidade do linfócito T em relação ao tumor também desempenha um papel crucial na sua capacidade de induzir a morte celular.

Após a expansão REP, foi realizada também a mensuração de IFN- $\gamma$  para avaliar a ativação e a capacidade de secreção desta citocina pelos TILs. Os co-cultivos também foram realizados em diferentes proporções de células efetoras para células-alvo (1:1 e 10:1) e analisados em dois tempos de incubação (24h e 48h).

Os resultados utilizando a linhagem SK-MEL-24 mostraram que após 24 horas de co-cultivo, não foi observada diferença na secreção de IFN- $\gamma$  na condição apenas SK-MEL-24 e na proporção 1:1 (efetores:alvo), enquanto na proporção 10:1 registramos a secreção 8,37 pg/ml de IFN- $\gamma$ . Após 48 horas de co-cultivo, não foi observada diferença na

secreção de IFN- $\gamma$  na condição apenas SK-MEL-24 e na proporção 1:1 (efetores:alvo), enquanto na proporção 10:1 registramos a secreção 8,47 pg/ml de IFN- $\gamma$

Os resultados utilizando a linhagem autóloga MEL-21 mostraram que após 24 horas de co-cultivo, não foi observada diferença na secreção de IFN- $\gamma$  na condição apenas MEL-21 e na proporção 1:1 (efetores:alvo), enquanto na proporção 10:1 registramos a secreção 9,54 pg/ml de IFN- $\gamma$ . Após 48 horas de co-cultivo, não foi observada diferença na secreção de IFN- $\gamma$  na condição apenas MEL-21 e na proporção 1:1 (efetores:alvo), enquanto na proporção 10:1 registramos a secreção 9,05 pg/ml de IFN- $\gamma$

Os resultados indicam que a secreção de IFN- $\gamma$  pelos TILs é influenciada pela proporção de células efetoras em relação às células-alvo, reforçando a importância do número de linfócitos para a eficácia da resposta antitumoral. Além disso, a especificidade do linfócito em relação ao tumor também desempenha um papel crucial na sua capacidade de induzir a produção desta citocina.

## **DISCUSSÃO:**

Os resultados obtidos neste estudo, com uma taxa de sucesso de 88,3% na expansão de TILs a partir de 17 amostras de pacientes com melanoma metastático, demonstram que a metodologia empregada utilizando IL-2 em combinação com IL-7 está bem direcionada e é promissora para aplicações clínicas.

A caracterização fenotípica das subpopulações de TILs revelou um perfil imunológico favorável à atividade antitumoral, com predominância de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos e células auxiliares Th1, como também demonstrou a redução da proporção de linfócitos T reguladores (Tregs) quando utilizamos a IL-2 em altas doses.

A comparação funcional entre linhagens comerciais (como a SKMEL-24) e culturas autólogas derivadas de amostras metastáticas evidenciou que os TILs autólogos apresentam maior capacidade de induzir morte celular e produção aumentada de IFN- $\gamma$ , um marcador chave de resposta antitumoral. Esses dados reforçam a importância da personalização da terapia, utilizando amostras do próprio paciente para maximizar os resultados clínicos.

Avanços recentes em engenharia genética têm ampliado o potencial dos TILs. Estratégias como a superexpressão de receptores de quimiocinas e o uso de ferramentas como CRISPR-Cas9 (gerando os chamados CRISPR-TILs) têm como objetivo aumentar a resistência dos TILs ao ambiente tumoral, persistência e eficácia dessas células. Ensaios clínicos em andamento, como o NCT03645928, que combina TILs com pembrolizumabe, já demonstram taxas de resposta de até 60% em coortes preliminares, evidenciando o valor das terapias combinadas.

Estudos recentes, como o de Barras et al. (2024), destacam a relevância das interações entre células T e células mieloides no microambiente tumoral, sugerindo que a reprogramação do compartimento mioide pode representar uma estratégia adjuvante para potencializar os efeitos terapêuticos dos TILs [10].

Apesar dos avanços, diversos desafios persistem, incluindo a necessidade de otimizar protocolos de expansão celular, reduzir a toxicidade associada ao tratamento, e identificar biomarcadores preditivos de resposta. Futuras pesquisas devem focar na redução do tempo de produção dos TILs, melhoria da escalabilidade do processo, e exploração de sinergias com ICIs, terapias-alvo e modificações genéticas e epigenéticas (por exemplo, com o uso de inibidores de metilação). Além disso, a identificação de subgrupos de pacientes, com base em características imunológicas e moleculares do tumor, pode contribuir para uma abordagem terapêutica mais precisa e eficiente.

Julve e Furness revisaram a terapia com TILs em pacientes com melanoma cutâneo refratário aos ICIs, destacando sua atividade promissora nesse contexto. As células T ativadas podem ser submetidas à regulação imunológica, o que justifica a combinação dos TILs com anticorpos inibidores de checkpoints para potencializar tanto os linfócitos infundidos quanto a resposta das células T endógenas. Ensaios clínicos em andamento (NCT04165967, NCT03475134, NCT03374839, NCT01701674, NCT03638375, NCT02652455 e NCT03645928) avaliam abordagens combinadas, incluindo o uso de TILs com pembrolizumabe (pembro). O estudo multicêntrico de fase II (C-144-01) está investigando essa combinação em pacientes com melanoma, câncer de cabeça e pescoço (HNSCC) e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC). Os pacientes recebem uma dose única de pembrolizumabe após a ressecção tumoral e antes da linfodepleção, além de IL-2 adjuvante. O esquema terapêutico prevê a continuidade do pembrolizumabe após a infusão dos TILs por até 24 meses. Resultados preliminares apresentados em 2021 revelaram uma taxa de resposta de 60% (6/10 pacientes), com três respostas completas, e segurança compatível com o perfil esperado para linfodepleção não mieloablativa, IL-2 e pembrolizumabe<sup>11</sup>.

Embora os dados clínicos sejam promissores, ensaios clínicos randomizados adicionais são essenciais para validar plenamente a eficácia dos TILs, estabelecer protocolos terapêuticos otimizados e superar obstáculos técnicos, como a redução da toxicidade, o refinamento do processo de produção e a melhoria da logística para aplicação em larga escala. Dado o sucesso observado no melanoma metastático, a expansão do uso da terapia com TILs para outros tumores sólidos representa uma perspectiva real e relevante, especialmente para pacientes com doença avançada refratária a tratamentos convencionais. Além disso, um melhor controle dos efeitos adversos é altamente desejável. Por fim, as pesquisas futuras devem continuar a explorar novas combinações terapêuticas, estratégias de modificação genética, e o aprofundamento na compreensão do microambiente tumoral, a fim de aprimorar os desfechos clínicos e aumentar as taxas de sobrevida de pacientes com câncer avançado<sup>12</sup>.

## **CONCLUSÃO:**

A terapia com linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) representa um avanço promissor e significativo no tratamento do melanoma metastático, proporcionando respostas duradouras mesmo em pacientes refratários às terapias convencionais. A incorporação de inovações tecnológicas, como a engenharia genética e protocolos de expansão

otimizados, aliada a uma compreensão mais profunda do microambiente tumoral, será essencial para consolidar essa estratégia como uma abordagem terapêutica eficaz, segura e amplamente acessível. À medida que o conhecimento avança, espera-se que a terapia com TILs não apenas amplie suas indicações dentro do melanoma avançado, mas também seja aplicada com sucesso a outros tipos de tumores sólidos, oferecendo novas perspectivas para pacientes com cânceres de difícil tratamento.

## REFERÊNCIAS

1. INCA (Instituto Nacional de Câncer--Brasil). Available online (accessed on 10 February 2024).
2. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 15;12(4):298-306. doi: 10.1038/nrc3245.
3. Sarnaik AA, Hamid O, Khushalani NI et al.. Lifileucel, a Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy, in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2021 Aug 20;39(24):2656-2666. doi: 10.1200/JCO.21.00612. Epub 2021 May 12. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2021 Sep 10;39(26):2972. doi: 10.1200/JCO.21.01866.
4. van den Berg JH, Heemskerk B, van Rooij N et al.. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma: boosting of neoantigen-specific T cell reactivity and long-term follow-up. *J Immunother Cancer*. 2020 Aug;8(2):e000848. doi: 10.1136/jitc-2020-000848.
5. Alexandru Gata V, Milan Kubelac P, Buiga R et al.. The value of tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor for lymph node status and survival amongst patients with cutaneous malignant melanoma. *J BUON*. 2020 Nov-Dec;25(6):2700-2707.
6. Angeramo CA, Laxague F, Armella ED et al. .Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Melanoma: Which Is Its Prognostic Value? *Indian J Surg Oncol*. 2021 Dec;12(4):770-775. doi: 10.1007/s13193-021-01427-0.
7. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):62-8. doi: 10.1126/science.aaa4967.
8. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1988 Dec 22;319(25):1676-80. doi: 10.1056/NEJM198812223192527.
9. Betof Warner A, Corrie PG, Hamid O. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy in Melanoma: Facts to the Future. *Clin Cancer Res*. 2023 May 15;29(10):1835-1854. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1922.
10. Barras D, Ghisoni E, Chiffelle J et al.. Response to tumor-infiltrating lymphocyte adoptive therapy is associated with preexisting CD8<sup>+</sup> T-myeloid cell networks in

melanoma. *Sci Immunol*. 2024 Feb 2;9(92):eadg7995. doi: 10.1126/sciimmunol.adg7995.

11. Julve M, Furness AJ. Advances in the development of tumor-infiltrating lymphocyte therapy for advanced melanoma. *Expert Opin Biol Ther*. 2023 Apr;23(4):319-323. doi: 10.1080/14712598.2023.2193290.

12. de Oliveira Filho RS, de Oliveira DA, Nisimoto MM, Marti LC. A Review of Advanced Cutaneous Melanoma Therapies and Their Mechanisms, from Immunotherapies to Lysine Histone Methyl Transferase Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2023 Dec 8;15(24):5751. doi: 10.3390/cancers15245751.